



Studies on the effects on DNA methylation for the expression of embryogenesis-related genes in carrot and Arabidopsis thaliana

著者	渋川 登美子
内容記述	Thesis (Ph. D. in Science)--University of Tsukuba, (B), no. 2476, 2010.2.28 "November 2009"--Cover and spine Includes bibliographical references (leaves 70-82)
発行年	2010
URL	http://hdl.handle.net/2241/106271

[408]

氏 名 (本籍)	しづ かわ と み こ 渋 川 登美子 (東 京 都)		
学 位 の 種 類	博 士 (理 学)		
学 位 記 番 号	博 乙 第 2476 号		
学位授与年月日	平成 22 年 2 月 28 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科		
学 位 論 文 題 目	Studies on the Effects of DNA Methylation for the Expression of Embryogenesis-related Genes in Carrot and <i>Arabidopsis thaliana</i> (ニンジンとシロイヌナズナにおける胚発生関連遺伝子の発現に対する DNA メチル化の影響に関する研究)		
主 査	筑波大学教授	理学博士	鎌 田 博
副 査	筑波大学教授	理学博士	白 岩 善 博
副 査	筑波大学教授	理学博士	佐 藤 忍
副 査	筑波大学准教授	博士 (理学)	小 野 道 之

論 文 の 内 容 の 要 旨

多くの生物において DNA の特定残基にメチル化が起こることが知られており、遺伝子発現制御への関わりが示唆されている。実際、高等動物においては、胚発生時に DNA メチル化レベルおよびメチル化パターンが大きく変動し、胚発生制御遺伝子の発現制御を介して胚発生が的確に進行することを調節していることが知られている。一方、高等植物においては、ゲノムインプリンティングや外来遺伝子サイレンシングに DNA メチル化が関与することは知られているものの、胚発生における DNA メチル化の関与はほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では、胚発生のみを解析できるニンジン不定胚形成系、および、全ゲノム配列に関する多様な情報が整備され、各種変異体が揃っているシロイヌナズナを材料として用い、胚発生に伴う胚発生関連遺伝子の発現と DNA メチル化の関係、胚発生時に当該遺伝子の DNA メチル化を担う DNA メチル化酵素の特定等を行うことで、高等植物の胚発生に DNA メチル化が関与していることを明らかにすることを目的としている。

まずはじめに、ニンジン不定胚形成系を活用し、DNA メチル化感受性酵素を用いたゲノミックサザンブロット解析により、胚発生時に DNA メチル化が変動する胚発生関連遺伝子の探索を行い、*C-LEC1* 遺伝子を解析対象遺伝子として同定した。次に、*C-LEC1* 遺伝子上流配列について、胚発生に伴うメチル化シトシンの位置およびその変動を bisulfite 法によって調査した結果、*C-LEC1* 遺伝子の発現が見られる時期にのみ特定領域においてメチル化レベルが低下していることを明らかにした。さらに、RNA-directed DNA methylation (RdDM) 法を用いてこの特定領域を人為的に高メチル化したところ、*C-LEC1* 遺伝子の発現と本領域におけるメチル化レベルが負の相関を示すことが明らかとなった。他の胚発生関連遺伝子である *C-ABI3* では、上流領域におけるメチル化レベルは低く、メチル化の変動も見られなかったことより、特定の胚発生関連遺伝子のみが DNA メチル化による発現制御を受け、胚発生終了時に当該遺伝子の発現を強く抑制するための機構として DNA メチル化が機能する可能性が示唆された。

次に、ニンジンで見られた現象が他の生物においても見られるか否か、また、もし見られるとするとその

DNA メチル化をどのような DNA メチル化酵素が担っているかを明らかにするため、多様なゲノム情報が蓄積されているモデル植物シロイヌナズナを用いた解析を行った。最近ウェブ上に公開された全ゲノム配列に関する DNA メチル化情報を検索した結果、胚発生関連遺伝子のうち *FUS3* 遺伝子上流領域でのみ高度なメチル化が見られることが判明したため、この領域について種子形成過程におけるメチル化レベルの変動を詳細に解析したところ、種子発達段階によってメチル化レベルが変化し、*FUS3* 遺伝子の発現が低下する成熟種子において最もメチル化レベルが高まることが明らかとなった。そこで、RdDM 法によってこの領域に人為的な高メチル化を誘導したところ、高メチル化によって *FUS3* 遺伝子の発現が種子形成時にも低下するとともに、しいな種手の出現頻度が有意に増大した。この結果は、*FUS3* 遺伝子上流領域におけるメチル化が *FUS3* 遺伝子の発現を制御しており、種子発達に伴うメチル化レベルの変化による *FUS3* 遺伝子の発現制御が正常な種子形成に重要であることを示唆している。

一方、シロイヌナズナの各種 DNA メチル化酵素遺伝子欠損変異体を用い、*FUS3* 遺伝子上流領域のメチル化に関与する DNA メチル化酵素の特定を試みた。その結果、*de novo* 型 DNA メチル化酵素遺伝子である *DRM2* の変異体 (*drm2*) においては、*FUS3* 遺伝子上流領域におけるメチル化が成熟種子において低下しており、*FUS3* 遺伝子発現量も高いことが明らかとなった。維持型 DNA メチル化酵素遺伝子である *CMT3* の欠損変異体ではこのような現象は見られないことから、当該領域の DNA メチル化は胚発生に伴って新たにメチル化されるものであり、DNA メチル化を介した当該遺伝子の発現制御によって胚発生を正常に進行させていることが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、ニンジンおよびシロイヌナズナを用い、胚発生関連遺伝子、特に胚特異的転写制御因子遺伝子の発現制御に DNA メチル化が関与しているか否かを検討している。さまざまな解析の結果、ニンジンにおいては *C-LEC1* 遺伝子が、シロイヌナズナにおいては *FUS3* 遺伝子が、そのコード領域上流の特定配列において胚発生に伴って DNA メチル化レベルが変動し、DNA メチル化レベルと当該遺伝子の発現量が負の相関を示すことを、人為的にメチル化レベルを変動させることで明らかにした。さらに、シロイヌナズナの各種変異体を用い、*FUS3* 遺伝子上流配列における DNA メチル化部位とメチル化レベル、ならびに、*FUS3* 遺伝子の発現量との相関を調べ、種子形成時の DNA メチル化には *de novo* 型 DNA メチル化酵素の一種である *DRM2* が関与すること、DNA メチル化レベルと *FUS3* 遺伝子の発現量に負の相関が見られること等をはじめて明らかにした。

以上のように、本研究では、植物種毎にそのターゲット遺伝子は異なるものの、胚特異的転写制御因子遺伝子の発現制御に DNA メチル化が関与することをはじめて明らかにし、胚成熟時に当該遺伝子の発現抑制をより厳格に達成するために本機構が関与している可能性を示唆しており、今後の植物胚発生研究に大きな貢献をするものと期待される。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。